

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
em. Direktor: Prof.Dr. Dr. E. Weinig

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonasen

**Versuche mit Paraoxon, n-propyl-Paraoxon
und iso-propyl-Paraoxon**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

vorgelegt von

**Otmar Renner
aus Regensburg**

1973 # 287

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
em. Direktor: Prof.Dr. Dr. E. Weinig

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonasen

**Versuche mit Paraoxon, n-propyl-Paraoxon
und iso-propyl-Paraoxon**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

**vorgelegt von
Otmar Renner
aus Regensburg**

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1973

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	4
II. Problemstellung	16
III. Eigene Untersuchungen	17
IV. Ergebnisse und statistische Auswertung mit graphischen Darstellungen	22
V. Diskussion und Zusammenfassung	25
VI. Literaturverzeichnis	27

I. Einleitung

Seit vielen Jahren spielen die von SCHRADER in den vierziger Jahren entdeckten Phosphorsäureester in der Schädlingsbekämpfung eine tragende Rolle. Zu diesen Gruppen gehören auch O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat (Bayer), O,O-n-propyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat, O,O-iso-propyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat.

Die vermehrte Anwendung von organischen Phosphorinsektiziden bewirkte eine zunehmende Alkylphosphat-Resistenz bei Insekten. Als fundamentale Ursache für eine Resistenz sind physiologisch-chemische Vorgänge im Organismus anzusehen. Toxische Verbindungen können entgiftet werden durch: (JARCZYK 1966)

- a) Oxydation
- b) Reduktion
- c) Dehalogenierung und Dehydrohalogenierung
- d) Hydrolyse
- e) Konjugation
- f) Reaktion mit Schwefelverbindungen.

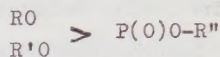
JARCZYK (1960) befaßte sich mit der enzymatischen Entgiftung organischer Phosphorinsektizide der E 605-Reihe im Insekt. Als Versuchstiere dienten ihm Raupen mehrerer

Lepidopterenarten. Organo-Phosphate abbauende Enzyme wurden bisher bei Insekten auch in Küchenschaben (O'BRIEN 1957, PLAPP und CASIDA 1958), Mücken (MATSUMURA und BROWN 1961 und 1963), Reiseuschrecken (KOJIMA und ISHIZUKA 1960), Spinnmilben (MATSUMURA und CASIDA 1961; OPENOORTH und VAN ASPEREN 1961) beschrieben.

Die Gewinnung der Enzyme gelang JARCZYK (1965) aus den Mitteldarmabschnitten der Lepidopteren-Raupen nach sorgfältiger Sektion der Därme und Homogenisation durch mehrstündige Zentrifugation bei 38 000 g x Min. und nachfolgender mehrfacher Chromatographie an Sephadex G 100 Säulen, womit er eine Trennung der Alkylphosphate angreifenden Hydrolasen von den Phosphatasen erreichte.

Für die Beziehung zwischen der enzymatischen Abbaurate "in vitro" und der chemischen Struktur der E 600-Homologe erstellte er folgende Tabelle:

Tabelle 1: Beziehung zwischen enzymatischer Abbaurate in vitro und chemischer Struktur der E 600-Homologen



	R	C ₂ H ₅ -	CH ₃ -	n-C ₃ H ₇	i-C ₃ H ₇	n-C ₄ H ₉
	R'	C ₂ H ₅ -	CH ₃ -	n-C ₃ H ₇	i-C ₃ H ₇	n-C ₄ H ₉
	R''	p-nitrophenol				
k=n · 10 ⁻⁴ · min ⁻¹						
a)	Rohgemisch	1,62	6,12	0,34	-	0,08
b)	P=O-Enzym	1,47	4,12	0,23	0,07	0,04
c)	P=S-Enzym	1,89	3,52	0,27	0,067	0,06
Umsatz = µMol/mg						
Total N/60 min						
a)	Rohgemisch	0,09	0,34	-	-	0,049
b)	P=O-Enzym	1,5	4,2	0,25	0,07	0,04
c)	P=S-Enzym	1,8	3,3	0,25	0,066	0,06

Der Umsatz bei meta und -ortho Methyl-E 600 ist also z.B. besser als bei Paraoxon, und zwar in der Reihenfolge o m p.

In den Mitteldärmen der Lepidopterenraupen finden sich zwei Organophosphat-Insektizide abbauende Hydrolasen, die sich hinsichtlich ihrer Umsatzzahlen, Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und ihrer Substratsspezifität voneinander unterscheiden. Beide Fermente haben ihre optimale Aktivität im schwach alkalischen Bereich.

Aufgrund seiner Untersuchungen schlägt JARCZYK (1965) zur Klassifizierung dieser Hydrolasen entsprechend der Internationalen Union für Biochemie die Schaffung einer neuen Gruppe bei den Hydrolasen vor. Der Schwerpunkt bei der Beurteilung sollte auf die Spaltung von Phosphorsäureestern ganz allgemein und nicht auf die Hydrolyse von Phenol-Estern (Gruppe 3.1.1.2 Acryl-ester-Hydrolasen) gelegt werden. Es sollten dann bezeichnet werden:

- 3.1.7 Phosphorsäuretriester-Hydrolasen
- 3.1.7.1 Orthophosphat dialkylarylester
 Nitrophenol-Hydrolasen
- 3.1.7.2 Orthothionophosphat dialkylaryl-
 ester Nitrophenol-Hydrolasen

Über die Frage, welches Enzym bzw. welche Enzyme verantwortlich sind für die Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen, sind von verschiedenen Seiten

umfangreiche Untersuchungen vorgenommen worden. Vornehmlich wurden hierbei Serumfraktionen als Enzymquelle verwendet. Da jedoch die gleichen Serumenzyme u.U. fähig sind, Ester zu spalten, die keinen Phosphor enthalten, ließ sich weniger über ihre Spezifität und Eigenschaften sagen als etwa bei den Gewebsenzymen (KOELLE 1963).

MAZUR und BODANSKI fanden 1946, daß sich im Plasma und in den Geweben von Kaninchen und Menschen ein DFP-hydrolysierendes Enzym befindet, welches sich nicht mit einer bekannten Cholinesterase oder Phosphatase identisch zeigte. Bei ihren Untersuchungen wurde DFP nur zu einem extrem niedrigen Anteil an der Alkyl-Esterbindung, jedoch im entscheidenden Maße an der Phosphor-Fluor-Bindung gespalten. MAZUR und BODANSKI (1946 b) konnten das verantwortliche Enzym 30-fach konzentrieren (unter Verlust der Phosphatase-, Esterase- und Cholinesterase-Aktivität) und gaben ihm den Namen "Phosphofluorase" bzw. "Fluorophosphatase" (GROB und Mitarb. 1947).

ALDRIDGE (1953 a) teilte die Serumesterase von Kaninchen, Pferd und Ratte nach ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in eine A-Esterase und B-Esterase ein. Jene Esterase, welche durch E 600 nicht aktiviert wurde, nannte er A-Esterase (Aryl- oder Aromatic-Esterase). In einer weiteren Arbeit fand ALDRIDGE (1953 b) ein E 600 hydrolysierendes Enzym

genannt E 600-Esterase, wobei er durch vergleichende Experimente bezüglich der Eigenschaften dieses Enzyms feststellte, daß sie identisch ist mit der schon bekannten A-Esterase aber nicht mit der sauren und alkalischen Serumphosphatase. Innerhalb der einzelnen Tiergattungen schwankten die jeweiligen Enzymaktivitäten, was seiner Meinung nach auf die Proteinunterschiede zurückzuführen ist.

Unter den fünf bestehenden Phenol-Ester hydrolysierenden Esterasen des menschlichen Blutes - (erythrocyte-acetylcholinesterase, plasma-butyrylcholinesterase, erythrocyte-aliesterase, erythrocyte-aromaticesterase, plasma-aromaticesterase) - scheinen nach MOUNTER und WHITTAKER (1953) die erythrocyte-aromatic-esterase und die plasma-aromatic-esterase, wenn nicht identisch, so doch extrem ähnlich zu sein.

Aufgrund der Untersuchungen dieser Autoren kann man es als wahrscheinlich betrachten, daß ebendiese mit der von ALDRIDGE (1953 a, 1953 b) gefundenen A-Esterase identisch sind.

Die ausgedehnten Untersuchungen über die enzymatische Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen von AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954 a, b, c, d, e, 1955 a, 1955 b, 1957) beschäftigen sich an erster Stelle mit

Tabun, welches durch ein Enzym hydrolysiert wird, einstweilen als "Tabunase" bezeichnet. Sie ist jedoch nicht spezifisch für Tabun, und so führten die Autoren eine allgemeine Bezeichnung für organische Phosphorverbindungen hydrolysierende Enzyme ein, nämlich "Phosphorylphosphatase". Letztere und die Cholinesterase konnten sie in Cohn'schen Fraktionen aus dem menschlichen Serum von anderen Esterasen trennen (Fraktion IV-1 : Tabunase, Fraktion IV-6 : Cholinesterase) (AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER 1954 b). Es wurde ferner vermutet, daß Tabun und DFP (Diisopropylfluorophosphat) vom selben Enzym hydrolysiert werden.

Tabun wird bei der hydrolytischen Spaltung an der P-CN-Bindung getrennt. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte üben einen schwach hemmenden Einfluß auf die Tabunaseaktivität aus (etwa 15 % des ursprünglichen Tabun wird in der enzymatischen Hydrolyse nicht angegriffen (AUGUSTINSSON 1954 c). In einer weiteren Arbeit untersuchten AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954 a) die Spezifität jener Phosphoryl-phosphatase (= Tabunase). Ihre Ergebnisse zeigten, daß von ihr (isoliert innerhalb der Fraktion IV-1) sowohl Tabun, DFP wie Mintacol = E 600 hydrolysiert werden, E 600 jedoch noch durch "andere" Enzyme gespalten werden kann. Unter anderem

stellten sie hierbei fest, daß Chlorthion nicht angegriffen wird. In vergleichenden Experimenten zwischen Tabun und Mintacol zeigten AUGUSTINSSON und Mitarbeiter (1954e), daß (speziell im Kaninchenblut) zwei Enzyme vorhanden sind, wobei jedes Enzym jedes Substrat spaltet, und daß das Enzym, welches Mintacol spaltet, von ALDRIDGE A-Esterase genannt, nicht identisch ist mit der Tabunase.

AUGUSTINSSON vermutet deshalb, daß E 600 sowohl durch jene Aldridge'sche A-Esterase als auch durch eine Phosphorylphosphatase hydrolysiert wird, beide wahrscheinlich anwesend in der Cohn'schen Fraktion IV-1.

1960 versuchte dann MAIN das Paraoxon-hydrolysierende Enzym aus dem Schafs-Serum möglichst rein darzustellen. Durch eine 350-385-fache Reinigung resultierte ein elektrophoretisch ermitteltes 80 - 95 %ig reines Enzympräparat. MAIN stellte bei der gereinigten Fraktion eine Zunahme (0,29 mM auf 4,2 mM) der Michaelis-Konstante fest, was er auf "Paraoxonase"-Aktivatoren im Nativserum zurückführte, welche durch den Reinigungsvorgang entfernt worden zu sein scheinen. Außerdem ermittelte er das Molekulargewicht der Paraoxonase mit 35 000 - 50 000.

Bei in vitro Versuchen mit den Seren weißer Mäuse untersuchten SCHAUMANN und SCHILLER (1960) die Inaktivierung

von Cholinesterase-Hemmern. Hierbei gingen sie davon aus, daß an der Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge beteiligt sind: Eine Absorption an das Serum und eine fermentative Zerstörung. Paraaxon wird durch das Serum schnell abgebaut und außerdem stark absorbiert.

1961 gelang es dann ERDÖS und BOGGS, die Vermutung früherer Arbeiten zu bekräftigen, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von Paraaxon im menschlichen Serum verantwortlich sind. Sie zeigten, daß die Paraaxon-hydrolysierende Aktivität in der Fraktion IV-1 zwar durch Äthylendiamintetraacetat vollständig gehemmt werden kann, daß aber hierbei nicht die Gesamtaktivität des Nativserums erfaßt war. Auf der Suche nach einer Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität fanden sie eine E 600-spezifische Enzymaktivität im Humanalbumin (Fraktion V), welche durch Aluminon (Aurintricarbonsäure) völlig auszuschalten war. Bei Mischung der Fraktionen IV-1 und V waren die Ergebnisse mit den selektiven Inhibitoren ähnlich dem normalen Serum.

In die gleiche Richtung gingen die Untersuchungen von SKRINJARIC-SPOLJAR und Mitarbeitern (1968) mit menschlichem Serum. Als Substrat verwendeten sie Paraaxon und Armin, und es zeigte sich, daß für beide Substrate sowohl in der Fraktion IV-1 als auch in der Fraktion V

eine Aktivität bestand. In der erstgenannten war die Aktivität für beide Substanzen höher als in der zweiten. In der Fraktion IV-1 erwies sich die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität größer als die Armin-hydrolysierende. In der Fraktion V war genau das Gegenteil zu beobachten.

Ihre Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, daß mehr als ein Enzym für die Hydrolyse von Paraoxon (und für Armin) im menschlichen Serum existiert. Nativseren aber enthalten nach Meinung von SKRINJARIC-SPOLJAR und Mitarbeitern wahrscheinlich noch ein Enzym mit ausgesprochener "Paraoxonase"-Aktivität, da in der Mehrzahl der Seren Paraoxon schneller hydrolysiert wurde als Armin, wohingegen eine Mischung von Fraktion IV-1 und Fraktion V eine größere "Arminase"- als "Paraoxonase"-Aktivität hervorbrachte.

KRISCH (1968) unterscheidet hinsichtlich der E 600-spaltenden Aktivität des Serums beim Menschen zwei sich überlagernde Gruppen von Normalpersonen. Es ergibt sich daraus die Frage, ob diese Aktivitätsunterschiede auf quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder auf zwei qualitativ verschiedene Enzymproteine zurückzuführen sind. KRISCH findet bei den Versuchspersonen mit hohen und niedrigen Aktivitäten gleiche Michaeliskonstanten, wobei es im Einzelfall oft nicht möglich war, einzelne Personen wegen des großen Überlagerungs-

bereichs bestimmten Aktivitätsgruppen zuzuordnen. Auch hält er es für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Gruppen genetisch bedingt sind.

Untersuchungen von BURGIS sowie METZNER (in Vorbereitung) zeigen, daß beim Menschen Thiono-Verbindungen im alkalischen Milieu kaum einer fermentativen Spaltung durch menschliche Serumenzyme unterworfen sind. Das läßt vermuten, daß im Serum kein Enzym vorhanden ist, das die Alkyl-Aryl-Phosphorsäureester an der Anhydridbindung zu spalten vermag, solange auch Schwefel an die Phosphorsäure gebunden ist (AUGUSTINSSON 1954 d, BURGIS 1972). BURGIS stellte außerdem fest, daß Paraoxon und Methyl-paraoxon wahrscheinlich von dem gleichen Enzymsystem hydrolysiert werden (Korrelationskoeffizient = 0,965), und daß eine Substitution der Äthylgruppe durch Methylgruppen keinen Einfluß auf das enzymatische Hydrolyseverhalten der Paraoxonase nimmt.

NIRSCHL (1972) fand, daß bei Phosphorsäureestern die Stellung der Nitrogruppe im Arylrest ausschlaggebend ist für die Hydrolyse im stark alkalischen Milieu. Wie aus seinen Versuchen hervorgeht, läßt nur die Para-Stellung der Nitrogruppen eine Hydrolyse zu. Eine genauere Deutung dieses Befundes ist erst dann möglich, wenn man die Enzymstruktur der verantwort-

lichen Enzyme weiter aufgeklärt hat. Werden die Ergebnisse von NIRSCHL denen von JARCZYK gegenübergestellt, so läßt sich bereits aussagen, daß sich im menschlichen Serum ein völlig anderes Enzymverhalten gegen o-, m- und p- E 600 als bei den aus Insektenlarven isolierten Enzymen zeigt. Die im menschlichen Körper vorhandenen Enzyme scheinen wesentlich spezifischer zu sein als die in den aus Insektenlarven isolierten Fraktionen.

II. Problemstellung

In dieser Arbeit soll "in vitro" vergleichend die enzymatische Hydrolyse von O,O-Diäthyl-(p-nitrophenyl)-Phosphat (Bayer E 600), O,O-n-propyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat und O,O-iso-propyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat durch menschliches Serum untersucht werden. Zur Bestimmung einer eventuellen Abhängigkeit der Enzymaktivität sollen außerdem die Blutgruppen bezüglich des ABO-Systems und Da bestimmt werden. Die nach dem von KRISCH (1968) angegebenen Standardtest gewonnenen Ergebnisse sollen den von JARCZYK (1965) gewonnenen Ergebnissen gegenübergestellt werden, die er in Versuchen mit den aus den Mitteldärmen der Lepidopteren Raupen dargestellten Enzymen erarbeitete. Weiter soll geprüft werden, ob die von JARCZYK vorgeschlagene neue Bezeichnung der Hydrolasen, ohne Änderung oder Erweiterung für die im menschlichen Serum vorkommenden Enzyme übernommen werden kann.

III. Eigene Untersuchungen

Zu Grunde lag der Standardtest, wie er von KRISCH (1968) angegeben wurde. Als Enzymquelle wurde das nicht mehr als 24 Stunden alte Serum von 30 gesunden Blutspendern der Blutbank der Universität Erlangen verwendet. Davon waren sieben Personen weiblichen und 23 Personen männlichen Geschlechts. Das Serum wurde zur Untersuchung 1:5 mit 0,9 %igem NaCl verdünnt.

Von den zu untersuchenden Giften

O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat = E 600,
O,O-n-Propyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat und
O,O-iso-Propyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat

wurde je eine Stammlösung angesetzt, bestehend aus 1 ml Trispuffer mit pH 0,4 Aqua dest. und 0,003 ml Gift. Für die Untersuchungen wurden in eine auf konstanter Temperatur von 25,5° C gehaltene OS-Küvette (von der Schichtdicke 1 cm) 1,65 ml Glycerin-NaOH-Puffer mit pH 11,2; 0,25 ml (1:5 verdünntem Serum und 0,5 ml Stammlösung pipettiert. Gemessen wurde die Extinktion der durch Hydrolyse freigesetzten Menge an p-Nitrophenol in einem selbstregistrierenden Spektralphotometer, Modell DK 2 der Firma Beckmann Instruments, bei einer Wellenlänge von 405 nm. In Abständen von jeweils 30

sec wurde die Extinktion registriert. Ausgewertet wurde die Extinktionsdifferenz des Serumwertes von 120 sec abzüglich des Extinktionswertes des Leerwertes (E 600 im alkalischen Milieu bei pH 11,2 ohne Serum) über 6 min dividiert durch 3. Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in n-Mol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin NaOH Puffer pH 11,2)

$$405 \text{ nm} = 18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{Mol}^{-1}$$

zugrunde gelegt. 10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten demnach (bei d = 1 cm und 405 nm) eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml-Seren durch Multiplikation mit 20), der Meßzeit (Umrechnung auf 1 min durch Division durch 2) und des Absatzvolumens (2,4 ml; Multiplikation mit 2,4) errechnet sich die Aktivität (in $\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ Serum) nach folgender Formel

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= \frac{E \cdot 10 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1805 \cdot 2} \\ &= E \cdot 1329 \text{ (}\mu\text{/L Serum)} \end{aligned}$$

Zur Bestimmung einer eventuellen Abhängigkeit der En-

zymaktivität wurde außerdem die Blutgruppenzugehörigkeit des ABO-Systems und Dd für 30 Personen ermittelt.

In der folgenden Tabelle 2 sind von den 30 untersuchten Personen Name, Blutgruppe im ABO-System, Rh-Faktor und Enzymaktivität bei Verwendung von Äthyl-Paraoxon und n-propyl-Paraoxon als Substrat aufgeführt. In der letzten Spalte ist die Aktivität mit n-propyl-Paraoxon als Substrat in % der Aktivität mit Paraoxon als Substrat angegeben (%). Die Personen sind nach steigender Enzymaktivität, bei E 600 als Substrat, geordnet.

In Abb. II ist der Zusammenhang zwischen Äthyl-Paraoxon und n-propyl-Paraoxon spaltenden Aktivitäten des menschlichen Serums dargestellt.

Tabelle 2: Name, Blutgruppe im ABO-System, Rh-Faktor und Enzymaktivität bei Verwendung von Äthyl-Paraoxon und n-propyl-Paraoxon als Substrat bei 30 untersuchten Personen

Vers. Nr.	N a m e	Rh-Faktor Blutgruppe	Aktivität m. Substrat		%
			E 600	n-propyl-E 600	
1	Albrecht Walter	B/pos	54	54	100
2	Bock Gudrun	B/pos	56	68	121
3	Rudel Georg	O/pos	59	65	112
4	Marcone Romas	O/pos	70	93	133
5	Reck Matthäus	O/neg	77	12	16
6	Weitmann Anneliese	B/pos	77	117	152
7	Tropisch Rolf	A ₂ /pos	85	116	137
8	Wunderlich Otto	O/pos	92	50	54
9	Forster Richard	O/pos	92	102	111
10	Renner Otmar	A ₁ /pos	94	66	70
11	Born Vera	O/pos	96	100	104
12	Körner Heidi	A ₁ /pos	105	137	131
13	Hirtbach Rüdiger	B/pos	117	47	40
14	Schels Ulf	O/neg	201	117	58
15	Entian Herbert	A ₂ /pos	204	114	56
16	Lachmann Werner	A ₂ /pos	233	81	38
17	Eckert Theobald	A ₁ /pos	217	62	29

Vers. Nr.	N a m e	Rh-Faktor	Aktivität m. Substrat		%
		Blutgruppe	E 600	n-propyl-E 600	
18	Mottel Werner	A ₁ /pos	253	98	39
19	Schott Gottfried	A ₁ /neg	254	110	49
20	Grasse Sabine	A ₂ /pos	260	129	50
21	Sangel Horst	A ₁ /pos	263	102	39
22	Ganzmüller Thomas	A ₁ /pos	266	133	51
23	Trebbe Käte	O/pos	271	84	31
24	Franken Gunnert	B/pos	279	141	57
25	Hertlein Richard	A ₂ /pos	295	121	41
26	Wintling Elmer	O/neg	319	81	25
27	Ossege Paul	B/pos	326	56	18
28	Schuler Rolf	O/pos	330	86	26
29	Becher Christine	O/pos	338	117	35
30	Stillrich Friedrich	O/pos	372	82	22

Mit iso-Propyl-E 600 konnte unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen keine Enzymspaltung festgestellt werden.

IV. Ergebnisse und statistische Auswertung
mit graphischen Darstellungen

Die für Äthyl-Paraoxon gefundenen Werte liegen zwischen 54 und 372 $\mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ Serum. Die statistische Auswertung der Meßwerte brachte folgende Ergebnisse:

Man kann bezüglich der Paraoxonase-Aktivität drei Typen von Seren differenzieren:

			<u>mit dem</u> <u>Mittelwert</u>	<u>u. der Standard-</u> <u>abweichung</u>
Gruppe I:	zwischen	50-120 U/l	82,6 U/l	19,3
Gruppe II:	zwischen	200-220 U/l	208,7 U/l	7,5
Gruppe III:	über	250 U/l	296,7 U/l	12,0

siehe Abb. I: Verteilung von Enzymaktivitäten von 30 Personen
im Wahrscheinlichkeitsnetz

Wir haben die drei Gruppen in Bezug auf die Standardabweichung mit der F-Prüfung und den Mittelwert mit der t-Prüfung verglichen. Es ergab sich mit 99 % Sicherheit ein signifikanter Unterschied zwischen Mittelwerten der Gruppen I - II, sowie zwischen Mittelwerten der Gruppen II - III.

Bei den 30 untersuchten Personen, von denen 7 weiblichen und 23 männlichen Geschlechts waren, wurden

12 x Blutgruppe A
 12 x Blutgruppe O
 6 x Blutgruppe B
 3 x O/neg
 1 x A/neg
 26 x Rh-Faktor pos.

festgestellt.

Die folgende Tabelle gibt die genauere Aufschlüsselung der Blutgruppen im ABO- und Dd-System und die Gruppeneinteilung der Enzymaktivitäten wieder.

Tabelle 3: Anteil der Versuchspersonen im ABO- und Dd-System

	A ₁ /pos	A ₂ /pos	B/pos	O/pos	A ₁ /neg	O/neg	
ges.	6	5	6	9	1	3	
Paraoxonase-Gruppen							
I:	2	1	4	5	0	1	ges. 13
II:	1	2	0	0	0	1	ges. 4
III:	3	2	2	4	1	1	ges. 13

Aufgrund der angestellten Untersuchungen läßt sich keine Blutgruppenabhängigkeit für die Systeme ABO und rh⁻/Rh⁺ feststellen.

Betrachten wir die Enzymaktivität bei n-propyl-Paraoxon als Substrat, so stellen sich ganz neue Gesichtspunkte heraus. N-propyl-Paraoxon wird zwar nicht so stark abgebaut wie Äthyl-Paraoxon (die höchste Aktivität liegt im Vergleich zu Äthyl-Paraoxon noch in der Gruppe I), jedoch zeigt sich bei 9 Personen (2 x Blutgruppe A, 3 x B, 4 x O), daß n-propyl-Paraoxon stärker abgebaut wird als Äthyl-Paraoxon. Hierfür läßt sich noch keine statistische Auswertung aufstellen, da die Anzahl der Versuchspersonen zu gering ist.

Bei den 30 untersuchten Personen lagen die gefundenen Werte für die Enzymaktivität von n-propyl-Paraoxon zwischen 12 und 141 $\mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ Serum. Auch hier läßt sich keine Blutgruppenabhängigkeit im ABO- und Dd-System nachweisen.

V. Diskussion und Zusammenfassung

Vergleichen wir unsere Ergebnisse mit denen, die JARCZYK (1965) aus Versuchen mit Insektenlarven gewonnen hat, so finden wir im menschlichen Serum ein völlig anderes Enzymverhalten vor.

Aus den Versuchsergebnissen der Hydrolyse von Äthylparaoxon, n-propyl-Paraoxon und iso-propyl-Paraoxon im menschlichen Serum läßt sich auf Enzyme schließen, die Äthyl-Paraoxon und n-propyl-Paraoxon zu spalten vermögen. Bei iso-propyl-Paraoxon ist fast keine Enzymaktivität nachzuweisen, was auf die sterische Anordnung zurückzuführen sein kann. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß im menschlichen Blut Serumenzyme vorhanden sind, welche iso-propyl-Paraoxon hydrolysieren, denn es ist durchaus möglich, daß durch das stark alkalische Milieu unter unseren Versuchsbedingungen spezifische Enzyme gehemmt oder zerstört worden sind. Erst wenn über die Enzymstruktur nähere Erkenntnisse gewonnen werden, kann man darüber genauere Aussagen machen.

Äthyl-Paraoxon und n-propyl-Paraoxon werden im menschlichen Serum sehr gut hydrolysiert. Eine Korrelation zwischen n-propyl-Paraoxon und Äthyl-Paraoxon konnte jedoch unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen

nicht festgestellt werden. Die am menschlichen Serum gewonnenen Erkenntnisse zeigen deutlich, daß der von JARCZYK 1965 gemachte Vorschlag zur Klassifizierung ernsthaft diskutiert werden muß. Das menschliche Serum scheint ein relativ spezifisch auf die Spaltung von Paraoxon ausgerichtetes Enzym zu besitzen, das zwar noch Methyl-Paraoxon und P-O-Chlorthion (METZNER) und, wie die vorliegende Arbeit zeigt, u.U. auch n-propyl-Paraoxon spalten kann, nicht aber - vermutlich aus sterischen Gründen - iso-propyl-Paraoxon oder Paraoxon-Homologe, in denen die Nitrogruppe am Phenylrest nicht mehr in Para-Stellung steht (NIRSCHL, 1972).

Verteilung der Enzymaktivitäten von 30 Personen im Wahrscheinlichkeitsnetz

Abb. I

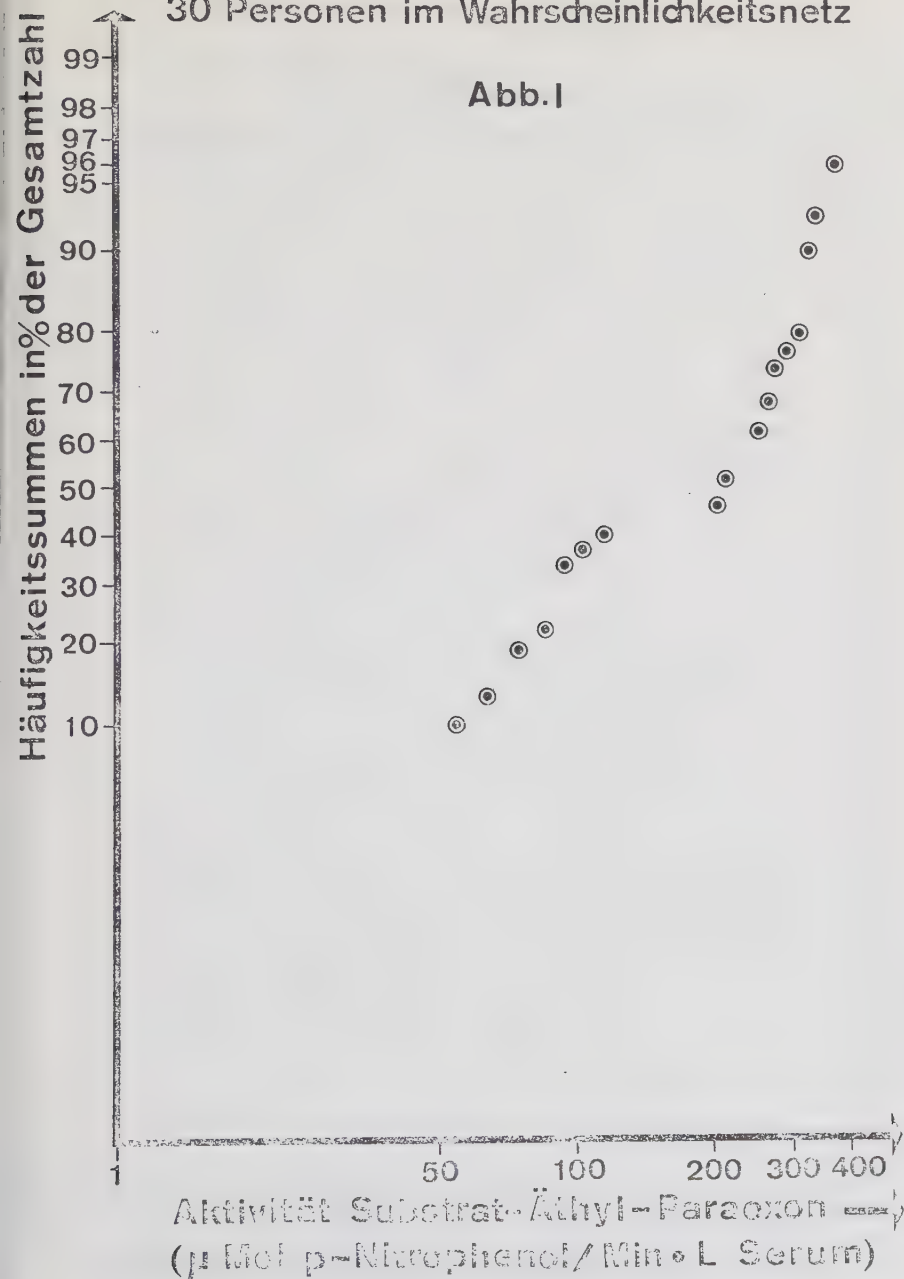


Abb. II

↑
Aktivität

Substrat-Äthyl-Paraoxon
(μ Mol p-Nitrophenol/Min • L Serum)

400

300

200

100

80

60

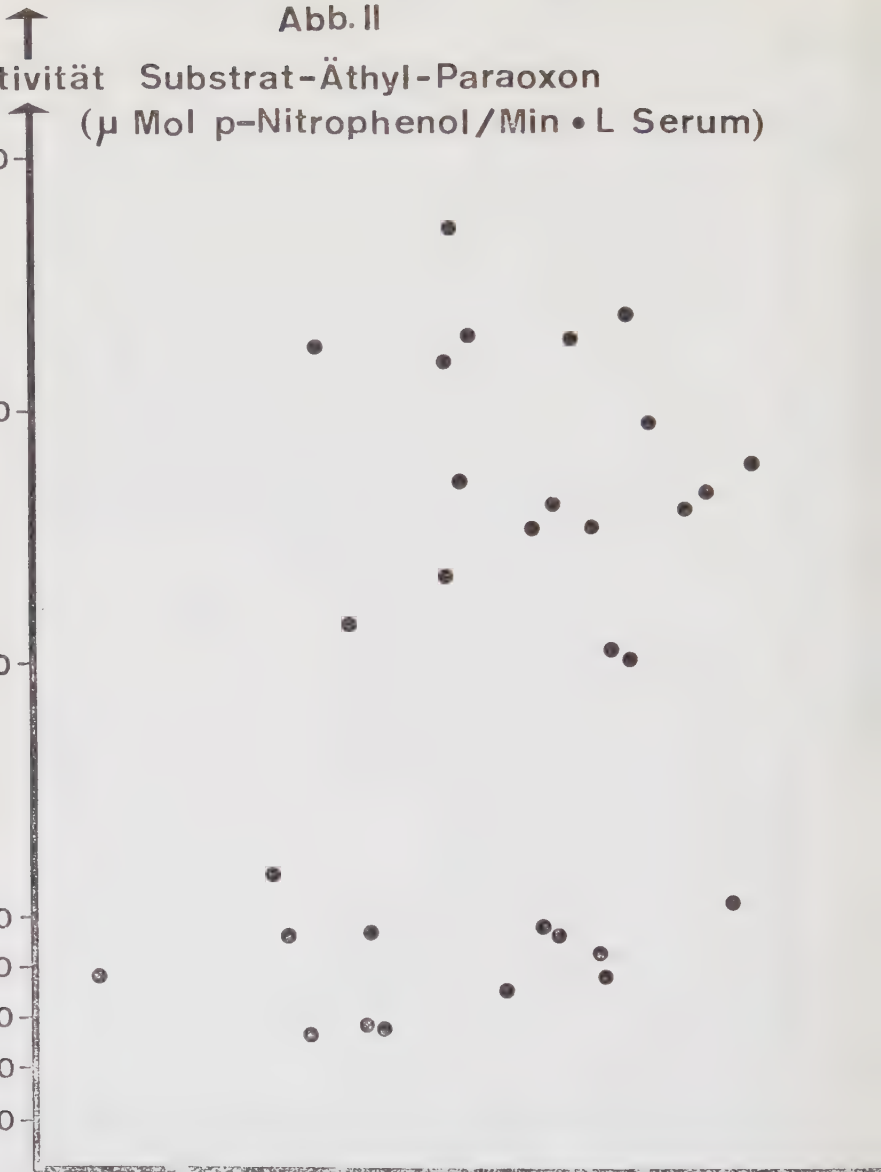
40

20

20 40 60 80 100 120 140 160

Aktivität Substrat n-Propyl-Paraoxon

(μ Mol p-Nitrophenol/Min • L Serum)



VI. Literaturverzeichnis

1. ALDRIDGE, W.N.

Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetat, propionate and butyrate, and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

2. ALDRIDGE, W.N.

Serum Esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

3. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

4. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
I. Occurence of enzymes hydrolysing dimethylamido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun).
Acta Chem. Scand. 8, (1954 b)

5. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
II. Analysis of reaction products in experiments
with Tabun and some properties of blood plasma
tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 762 (1954 c)
6. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
III. Effect of cholinesterase inhibition and in-
hibition of cholinesterase in the presence of
tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954 d)
7. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
IV. Specificity studies.
Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 e)
8. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inacti-
vation of cholinesterase by organophosphorus com-
pounds in vitro.
Acta Chem. Scand. 9, (1955 a)

9. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
VI. Effect of metallic ions on the phosphoryl-
phosphatases of human serum and swine kidney.
Acta Chem. Scand. 9, 383 (1955 b)
10. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
VII. The stereospecificity of phosphorylphospha-
tases.
Acta Chem. Scand. 11, 1371 (1957)
11. BAUMGARTNER, W.
Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen
fermentativem E 600-Abbau und Vergiftung der
Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum.
Dissertation Erlangen (1970)
12. BURGIS, H.
Untersuchungen über den fermentativen Abbau von
E 600, Methyl-E 600, E 605 und Methyl-E 605 im
menschlichen Serum.
Dissertation Erlangen (1972)
13. ERDÖS, E.G. und L.E. BOGGS
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature 190, 716 (1961)

14. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT M. und H.H. LINDORF
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
cholinesterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesell-
schaft für Rechtsmedizin in Berlin 6.-9-10.1969
15. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT M., U. RABAST und
H.H. LINDORF
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-
(p-nitrophenyl)-phosphat.
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)
16. GROB, D., LILLIENTHAL J. L. Jr., A. M. HARVEY und
B.P. JONES
The administration of di-isopropyl fluorophosphate
(DFP) to man.
I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase;
general systemic effects; use in study of hepatic
function and erythro-poiesis; and some properties
of plasma cholinesterase.
Bulletin John Hopkins Hospital 81, 217 (1947)

17. JARCZYK, H.J.

Nachweis und Charakterisierung von Phosphor- und Thionophosphorsäureester der E 605-Reihe spaltenden Hydrolasen aus Mitteldärmen von Lepidopteren-Raupen.

Z. Naturforschung 20 b, 257 (1965)

18. JARCZYK, H.J.

Der Einfluß von Esterasen in Insekten auf den Abbau von Phosphorsäureestern der E 605-Reihe.

Pflanzenschutznachrichten "Bayer" 19, 1 (1966)

19. KOELLE, G.B.

Cholinesterase and anticholinesterase agents.

Handbuch der experimentellen Pharmakologie,

Ergänzungswerk XV.

Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)

20. KRISCH, K.

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) durch menschliches Serum.

Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

21. LA MOTTA, R.V. und Ch.L. WORONICK

Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase.

Clin. Chem. 17, 135 (1971)

22. MAIN, A.R.

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum.
Biochem. J. 74, 10 (1960)

23. MAZUR, A. und O. BODANSKY

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of cholinesterase activity by diisopropyl fluorophosphate.
J. Biol. Chem. 163, 261 (1946 a)

24. MAZUR, A. und O. BODANSKY

An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates.
J. Biol. Chem. 164, 271 (1946 b)

25. METZNER, H.

Dissertation Erlangen, in Vorbereitung

26. MOUNTER, L.A. und V.P. WHITTAKER

The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases.
Biochem. J. 54, 551 (1953)

27. NEAL, R.A.

Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) in vitro.
Biochem. J. 103, 183 (1967)

28. NIRSCHL, H.
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.
Versuche mit m-, o- und p-Nitro-E 600.
Dissertation Erlangen (1972)
29. SCHAUMANN, W. und M. SCHILLER
Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und
im Serum.
Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)
30. SCHRADER, G.
Chlorthion: Ein neues wenig giftiges Insektizid
aus der Reihe der Thiophosphorsäureester.
Angewandte Chem. 66, 265 (1954)
31. SCHRADER, G.
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-
ester.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1963)
32. SKRINJARIC-SPOLJAR, M. und E. REINER
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and
ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera.
Biochim. Biophys. Acta 165, 289 (1968)
33. WAGNER-JAUREGG, Th.
Modellreaktionen phosphorhaltiger Enzym-
Inaktivatoren.
Arzneimittel-Forschung (Aulendorf) 4, 527 (1954)

Lebenslauf

Name : Otmar Renner

geboren : 7. Februar 1946

in : Regensburg

Staats-
angehörigkeit : deutsch

Name
der Eltern : Alfons Renner, Kaufmann
Rosina Renner, geb. Haberkorn

Schulbildung : 1952-1957 Volksschule
Regensburg-Reinhausen
1957-1961 Staatl. Oberrealschule
Regensburg
1961-1965 Städt. Wirtschaftsober-
realschule Regensburg
1965-1967 Hanns Seidel Gymnasium
Amberg/Oberpfalz

Studiengang : WS 1967/68 - SS 1973 Studium der Zahn-
medizin an der Universität Erlangen-
Nürnberg

Prüfungen : Abitur Juni 1967
Vorphysikum Juli 1968
Physikum Mai 1970
Zahnmedizinisches Staatsexamen:
im Juni 1973

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihr freundliches Entgegenkommen und für die überaus große Hilfsbereitschaft.

